

**Válasz Prof. Dr. Kéki Sándornak, a MTA doktorának**  
**„LÉZERES MINTABEVITELRE ÉPÜLŐ TÖMEGSPEKTROMETRIÁS**  
**MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE ÉS ALKALMAZÁSA BIOAKTÍV**  
**VEGYÜLETEK VIZSGÁLATÁBAN” című MTA doktori értekezésemről készített**  
**opponensi bírálatára**

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Kéki Sándor professzor úrnak, hogy elvállalta doktori munkám bírálatát, illetve időt és energiát áldozva elkészítette opponensi véleményét disszertációmról. Köszönöm a méltató szavakat, a kritikai megjegyzéseket, a tézispontjaim elfogadását és az MTA doktori disszertációm nyilvános vitára bocsátásának támogatását.

Az opponens megjegyzéseire és kérdéseire adott válaszaimat az alábbiakban foglalom össze:

**Megjegyzések:**

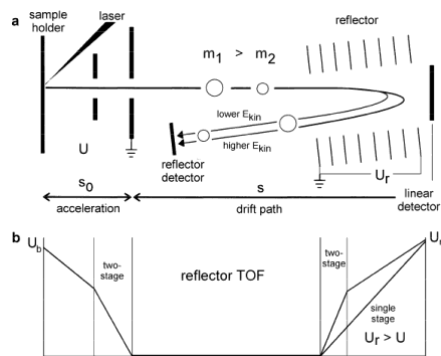
1. Köszönöm opponens úr megjegyzését! Dolgozatom elkészítése során törekedtem a tématerület átfogó, de az olvasó számára nem túlzottan száraz szakirodalmi ismertetésére.
2. A disszertációban törekedtem a tömegspektrometriás terminológia pontos és szakszerű alkalmazására, azonban sajnálatos módon néhány következtlen vagy félreérthető megnevezés mégis bekerülhetett a dolgozatomba.

A molekulaion kifejezést az  $M^+$  és  $M^{*+}$ , illetve  $M^-$  esetében kívántam alkalmazni, míg a kvázi-molekulaion többnyire a protonált  $[M+H]^+$  vagy deprotonált  $[M-H]^-$  ionizált formákra vonatkozik, de használhatjuk a Na, K, mátrix stb. adduktok esetében egyaránt.

3. Köszönöm a korrekciót, egyetértek opponens úr véleményével, hogy a nagy felbontás szakszerűbb kifejezés lett volna!
4. Köszönöm opponens úr megjegyzését, dolgozatomban valóban több helyen keveredik a két kifejezés és előfordul a helytelen használat.

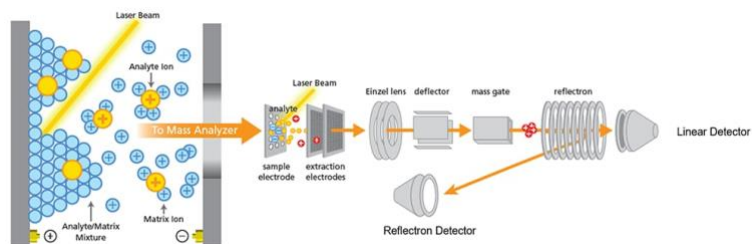
A reflektoron, egy elektrosztatikus potenciálgradiens segítségével működő iontükör, amely az ionforrásban keletkezett ionok kinetikai energia-eloszlásának korrekcióját és főként a spektrális felbontás, valamint a tömegpontosság növelését célozza.

Egyetértek opponens úr azon véleményével, hogy a tömegspektrometriában a reflektoron kifejezés az általánosan elfogadott, azonban a reflektoron és reflektor (ionreflektor) kifejezések használata a szakirodalomban is némi következtelenséget mutat, amit az alábbi ábrákon is szemléltetek.



J. H. Gross, Mass Spectrometry A Textbook, 2 nd Ed. (2008)

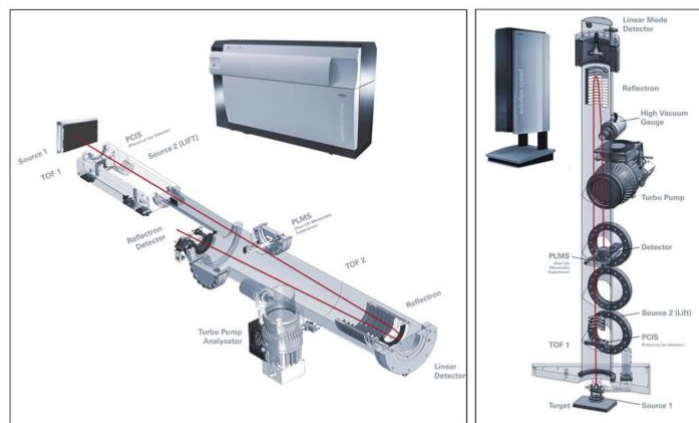
A reflektoronnal ellátott TOF tömeganalizátor egységén belül az ionok reflektoron módban történő detektálását egy microchannel plate (MCP) detektor végzi, amelyet reflektoron vagy reflektor detektornak nevezünk, megkülönböztetve a lineáris elrendezésben alkalmazott ún. lineáris detektortól. A szakirodalomban és a különböző tömegspektrométer gyártók által használt terminológiában is megtalálhatjuk mindkét kifejezést, amit sajnálatos módon én is átvettem és következetlenül használtam.



Shimadzu MALDI TOF MS berendezés felépítése

<https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/faq/maldi/maldi-basics/index.html>

Diagrams of autoflex speed and ultrafleXtreme MALDI-TOF/TOF MS systems



4

Bruker Daltonics

Bruker MALDI készülékek felépítése.

<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>

5. Köszönöm opponens úr megjegyzését. Az ábrákon valóban nem szerepelnek az ionizációs folyamatok során létrejövő töltések.

Az 5. táblázat tartalmazza az LDI TOF/TOF tömegspektrometriás körülmények között detektált fragmenseket. A táblázatban a detektált  $m/z$  értékek mellett zárójelben megadtam a 25-27. ábrákon szereplő molekulatöredékekre való utalásokat (pl. A/I.). Mivel egy-egy anyaiionból több fragmens iont is sikeresen detektáltunk így a töltés minden római számmal jelzett struktúráján megjelent volna, ami ugyancsak félrevezető lehet. Egyetértek opponens úr véleményével, hogy a táblázatban és az ábrákon szereplő eredményeket és azok értelmezését jobban, egyértelműbben kellett volna prezentálnom.

6. Opponens úr véleményével összhangban elismerem, hogy félreérthetően fogalmaztam az 5.1. fejezetben. A kérdéses mondat igazából éppen azt szeretné hangsúlyozni, hogy a MALDI TOF/TOF MS vizsgálat a megszokott polipeptidekre/fehérjékre jellemző tömegtartományon kívül még a kisebb molekulatömegű vegyületek szerkezet azonosítására is alkalmas lehet a megfelelő mátrix alkalmazásával. A kisebb molekulatömegű vegyületek MALDI vizsgálata és főként szerkezetazonosítása a mai napig számos kihívással küzd. Ezek közül a legismertebb a mátrixként alkalmazott anyag/anyagok interferenciájából és az erős ionszupressziós hatásából adódik. Ez a probléma az  $m/z$  800-3000, illetve magasabb tömegtartományban nem, vagy csak minimálisan jelentkezik. A dolgozat további fejezeteiben jól körvonalazódik, hogy a MALDI TOF/TOF MS kiválóan alkalmas triptikus peptidek, polipeptidek (pl. PACAP-38) aminosavszekvenciájának meghatározására. Végül a MALDI TOF/TOF MS szinte az egyetlen olyan tömegspektrometriás módszer, amely nagy, akár több százezer Dalton tömegű fehérjék „top-down” szerkezetvizsgálatára, natív állapotban is alkalmas lehet.
7. A disszertáció 69-70. oldalán röviden ismertettem a nano-DESI Orbitrap vizsgálatok során alkalmazott főbb paramétereket.

„Nanoporlasztásos deszorpciós elektroporlasztásos ionizációt (nano-DESI) használtunk az MS/MS spektrumok felvételére közvetlenül a könnyeket tartalmazó Schirmer papírokról ( $n=6$ ). A nano-DESI szonda két olvasztott szilícium-dioxid kapillárisból (ID 50  $\mu\text{m}$ , OD 150  $\mu\text{m}$ , Polymicro Technologies, Molex, Lisle, IL) állt, amelyek egymással 45°-os szöget zártak be. Az elsődleges és másodlagos kapillárisok között 0,5  $\mu\text{l}/\text{min}$  áramlási sebességgel 2% (V/V) hangyasav tartalmú metanol-víz (9/1, V/V) elegyet áramoltattunk. A másodlagos kapillárison keresztül a mintával érintkező oldószer a tömegspektrométer ESI forrásába jutott. A mintákat tartalmazó Schirmer papír felületét 10  $\mu\text{l}$  0,1%-os (V/V) TFA-val egy mikroszkóp tárgylemezen áztattuk, majd az üveglemezt motorizált mintamozgató asztalra helyeztük (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) és a nano-DESI szonda alá irányítottuk. Az anyagot nano-DESI szondával extraháltuk a Schirmer papír nedves felületéről, és QExactive Plus Orbitrap tömegspektrométerrel (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Németország) elemeztük. A műszer spektrális felbontását 70000-re ( $m/\Delta m$ ) állítottuk be és a vizsgálatok során 3 kV-os primer kapilláris feszültséget alkalmaztunk. A szelektív ionmonitorozást (SIM)  $m/z$  648,5 $\pm$ 2-re állítottuk, ami megfelel az általunk korábban nano-ESI-vel detektált 7-

szeresen töltött PACAP-38 ionnak ( $z=7$ ). A CID tandem tömegspektrometriás vizsgálatoknál prekursorionként az  $m/z$  648,5 $\pm$ 1 értéket állítottuk be (44. ábra).”  
Itt ragadom meg az alkalmat, hogy még egyszer kifejezzem hálámat Ingela Lanekoff professzor asszonynak a nano-DESI vizsgálatok során nyújtott segítségével.

8. Köszönöm a korrekciót! Egyetértek opponens úr helyesbítésével.
9. Köszönöm opponens úr megjegyzését. Mivel tudományos munkám jelentős részét biológiai és klinikai minták vizsgálata tette ki, így szükségesnek éreztem az analitikai feladatokat és módszerfejlesztéseket meghatározó tudományos alapproblémák felvázolását. Bevallom őszintén, nehéz volt megtalálni az ideális egyensúlyt a terjedelem és a megértést legjobban szolgáló mélység között, így elképzelhető, hogy néhol tömörebben kellett volna fogalmaznom.

### **Kérdések:**

1. A képképzési tömegspektrometriás alkalmazások esetén a molekulák szöveti diffúziója az adott eljárás függvényében változó mértékű kritikus paraméter. Minden esetben a komponensek migrációjának minimalizálására törekszünk, így a nagy térbeli felbontású és reprodukálható IMS vizsgálatok sikerességének záloga az optimális mintaelőkészítésben keresendő.

A MALDI IMS módszer kiemelkedően jó eredményeket mutat a heterogén szöveti struktúrák megtartása vonatkozásában. A tangenciális diffúzió elhanyagolhatósága a mátrixkristályosodási folyamat gyorsaságának és a nedvesedési paraméterek kontrollálásának köszönhető. Több szempontból is meghatározó a mátrix oldószerének párolgása, amely jelentősen befolyásolja a felületen kialakuló cseppben létrejövő diffúzió, a felületi extrakció és a mátrixkristályok struktúrájának paramétereit.

Munkám során az optimális képképzési paramétereket és a diffúzió csökkentését a következő stratégiával értem el:

- A szöveti diffúzió csökkentése érdekében a natív, tehát nem fixált mintákat a lehető leggyorsabban lefagyasztottam folyékony nitrogénben vagy -80°C-os mélyfagyasztóban.
- A szövetmintákat felolvasztás nélkül helyeztem a kriosztátba.
- A szövetmetszetek készítése kriosztátban, -20°C körüli hőmérsékleten történt.
- A szövetmetszeteket tartalmazó tárgylemezeket a képképzési tömegspektrometriás vizsgálatig -80°C-os mélyfagyasztóban tároltam.
- A szövetminták bevonása a MALDI mátrix vegyülettel speciális cseppképző, porlasztó vagy szublimációs eljárás segítségével történik. A mátrixoldat porlasztása esetében a cél az optimális térfogatú folyadék-cseppek létrehozása, amely a megfelelő extrakció mellett megtartja az eredeti molekuláris eloszlást. A mátrix mennyiségének optimalizálását és a felület homogén bevonásának minőségét porlasztási és szárítási ciklusokkal szabályoztam. Erre a célra a dolgozatban is

ismertetett, általunk kifejlesztett piezoelektromos porlasztó berendezést használtam (23-24. oldal).

Mindezek mellett a MALDI IMS térbeli felbontása akár 5-10 mikrométer is lehet még rutin felhasználás esetén is. Az oldalirányú diffúzió elhanyagolható mértékét disszertációm 103. és 105. ábrája is jól szemlélteti, ahol a kriosztátos metszést követően jól megőrződött a vizsgált komponensek sejtszintű lokalizációja.

A molekuláris diffúzió csökkentésének másik módja a szövetek, sejtek kémiai fixálása, amely történhet például formalinnal vagy etanollal. A klinikai gyakorlatban alkalmazott formalin fixált paraffinba ágyazott (FFPE) szövetblokkok képkalkotási tömegspektrometriás vizsgálatával kapcsolatban számos közlemény látott napvilágot (*Gorzolka et al. 2014 Histol Histopathol 29(11):1365-76.*, *Casadonte et al. 2017 Adv Cancer Res 134:173-200.*, *Taylor et al. 2025 Methods Mol Biol 2884:305-332.*). Azonban a vizsgálatok összetett mintaelőkészítést igényelnek és érzékenységük, reprodukálhatóságuk, valamint térbeli felbontásuk jelentősen elmarad a natív szövetminták eredményeitől.

Az in-vivo körülmények között elvégezhető lézer ablációs (pl. LAESI) technikáknál a szövetminták vagy sejtek nedvességtartalma jelentős lehet, amely növelheti az oldalirányú diffúzió lehetőségét. Azonban a szöveti és sejt szerkezetek integritásának megőrzése segítségével (nincs metszetkészítés) és megfelelő lézerfókuszálással akár sejtszintű felbontású információk is nyerhetők.

2. A képkalkotási tömegspektrometriás mérések kiértékelése több szempontból is hosszadalmas és nehéz folyamat. Egyrészt, a szövetmetszet előre meghatározott pontjairól a beállított tömegtartományon belül tömegspektrumokat rögzítünk. A spektrumok száma tetszőlegesen változtatható, de pixelenként tipikusan 300/500 spektrum kerül eltárolásra. Ebből következik, hogy egy nagyobb kiterjedésű minta esetében akár több százezer egyedi spektrum is keletkezik, amely hatalmas adatmennyiséget generál. A jelentős mennyiségű adat normalizálása, kalibrálása, szűrése, kiértékelése és értelmezése hosszadalmas folyamat. Ezt nehezíti az, hogy a különböző vegyületek adduktjai megjelennek a tömegspektrometriás eredményekben, különösképpen lipidek esetében. A jelenség jelentősen csökkentheti a tömegspektrometriás csúcsok intenzitását és így érzékenység csökkenést okoz az egyes célmolekulák esetében. Munkám során az azonosított lipid specieszekre jellemző protonált, valamint Na-mal és K-mal képzett kvázimolekulákat is megvizsgáltam. A kiértékelés során csak azokat a lipideket fogadtam el azonosítottak, amelyeknél a különböző ionformák lokalizációja egyezőséget mutatott a szöveti szerkezetében.

A különböző ionokkal képzett adduktok egységesítése érdekében illékonyabb Li-sókat (pl. Li-acetát) is alkalmazhatunk, ugyanis ilyenkor csak a  $[M+Li]^+$  detektálható (*Cerruti et al. 2011 Anal Bioanal Chem 401(1):75-87.*, *Horká et al. 2014 J Mass Spectrom 49(7):628-38.*), azonban én ezt az eljárást nem alkalmaztam.

3. Mint azt disszertációmban is röviden felvázoltam (11-15. oldal), a MALDI során bekövetkező ablációs/deszorpciós/ionizációs folyamatok egy része nem kellően

tisztázott. Így az ablációs gázfelhőben lezajló molekuláris átalakulásokról gyakran csak analógiákra épülő sejtéseink vannak.

A vizsgált ösztrogének (ösztron,  $\beta$ -ösztradiol, ösztriol) derivatizálás nélkül nehezen ionizálható apoláris vegyületek. Ezt azonban kissé árnyalja az A-gyűrűben megtalálható aromás fenolos hidroxicsoport, amelynek  $pK_a$  értéke ( $25^\circ\text{C}$ -on megközelítőleg 10,4-10,8) enyhén savas karakterű ahhoz, hogy negatív ionizációs módban történő ESI vagy MALDI során  $[\text{M}-\text{H}]^-$  kvázimolekulaionná deprotonálódjon. Ezzel szemben a progeszteron és a tesztoszteron 3-as szénatomján keto-csoport található, amely protonálódása révén elősegíti a pozitív ionmódban történő detektálást (Son, et al. 2014 *Bulletin-Korean Chemical Society* 35:1409)

4. A tömegspektrumokon a báziscsúcsok mellett megjelenő egyéb csúcsokat annak idején sajnos nem azonosítottuk. Valószínűsíthető, hogy a spektrumon megjelenő csúcsok a fullerén oldószereként használt toluolból származó szennyezőktől származhatnak. Ezt a feltevést arra alapozom, hogy az oldószert az intézetünkben desztilláltuk, így ez az egyetlen felhasznált vegyszer, ami nem volt ellenőrzött tisztaságú.

A 14. ábrán  $m/z$  311 megjelenő csúcs a tesztoszteron  $\text{Na}^+$  adduktja, amely számos vizsgálatunkban kimutatható volt.

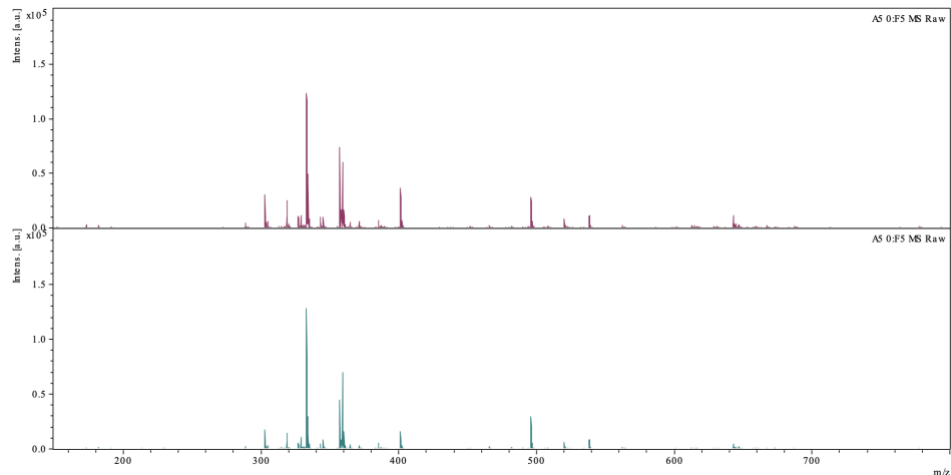
5. A 3. táblázat második oszlopában szereplő tömegértékek közül az első a negatív (ösztron,  $\beta$ -ösztradiol, ösztriol) illetve pozitív (progeszteron, tesztoszteron) ionizációs módban detektált deprotonált ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) valamint protonált ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) kvázimolekulaionjainak  $m/z$  értékei. Míg a második, zárójelben található értékek az adott vegyületek monoizotópos molekulatömegei. A negatív és pozitív ca. 1Da eltérések is ennek köszönhetőek. Elismerem, hogy a táblázat szerkesztésénél és feliratozásánál ezt az oszlopot kettészédhettem volna a pontosabb prezentálás érdekében.

A 3. táblázatban szereplő két módon megadott kimutatási határ a mintatartó lemez egy-egy pontjára szárított még megfelelő minőségben detektálható (jel/zaj arány 3:1) szteroid tartalmú oldat koncentrációját adja meg. A 3. oszlop ng-ban míg a 4. oszlop pmol-ban. A két érték megtartása az eredeti közleményből történt tartalmi módosítás nélküli adaptáció eredménye.

6. Munkám során kiterjedt vizsgálatokat végeztem különböző fullerének és fullerén származékok MALDI TOF MS elemzésével kapcsolatban. Vizsgáltam  $\text{C}_{60}$ ,  $\text{C}_{70}$  és magasabb szénatomszámmal rendelkező fulleréneket, illetve mechanokémiai módszerrel előállított származékaikat egyaránt. A fulleréneket a Sigma Aldrich-től vásároltuk, illetve Braun Tibor professzor úr bocsátotta a rendelkezésünkre, amit ezúton is hálásan köszönök neki. Tapasztalataink alapján a  $\text{C}_{70}$  fullerén alkalmazása eredményezte a legjobb ionizációs hatásfokot a vizsgált szteroidok vonatkozásában. A jelenség magyarázata a nagyobb szénatomszámú fullerén kiterjedtebb delokalizált elektronszerkezetében és a könnyebb gerjeszthetőségében keresendő. A fullerének MALDI mátrixként való alkalmazása során hátrányt jelent az optimális abláció/deszorpció/ionizáció nagyobb lézerfluencia igénye a konvencionális szerves

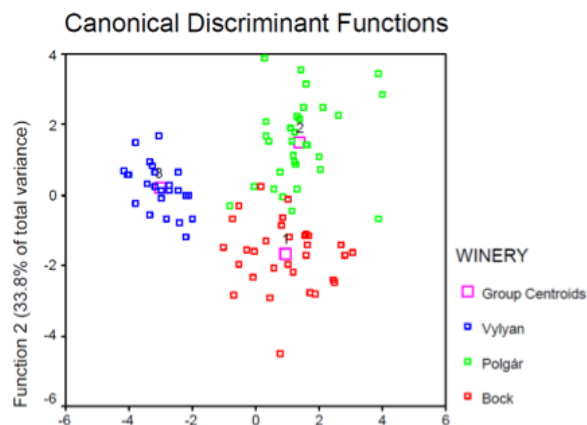
mátrixokhoz képest. A C<sub>70</sub> első ionizációs energiája (7,47 eV) valamivel alacsonyabb, mint a C<sub>60</sub> fulleréné (7,64 eV). Az elektronaffinitásban és a gerjeszthetőségben még nagyobb különbségeket tapasztalhatunk a C<sub>70</sub> asszimetriájának köszönhetően, ami segíti a MALDI elemi folyamatait és így javítja az ionizáció hatásfokát.

7. A mérések reprodukálhatóságára jellemző „nyers” tömegspektrumokat az alábbi reprezentatív ábrán mutatom be.

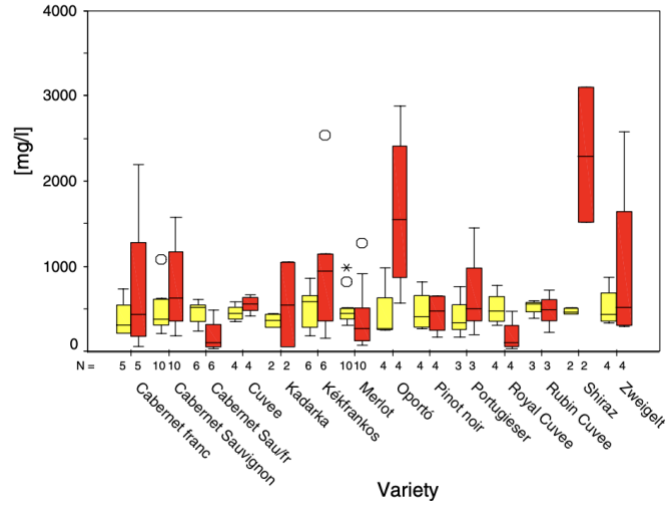


Azonos lézerfluencia és impulzusszám esetén az ismételhetőség elfogadhatónak bizonyult, bár mutatott némi ingadozást néhány komponens esetében. Az ismételhetőség jelentősen javítható volt a spektrumok normalizálásával (pl. ClinProTools) ami lehetővé tette a szemikvantitatív alkalmazást.

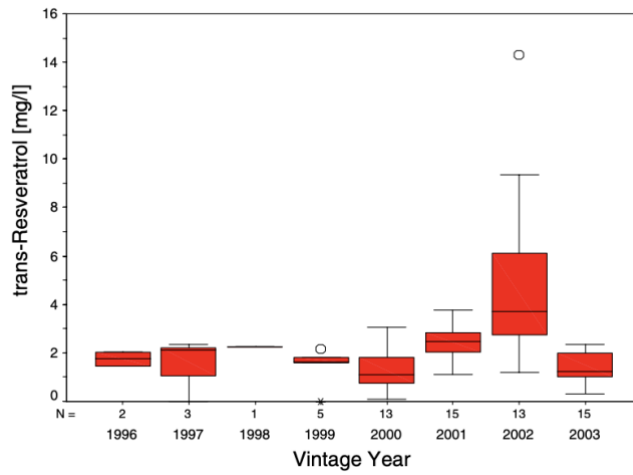
A borok polifenol és antocianin koncentrációinak fajta, évjárat és technológia függését már korábban HPLC vizsgálatokkal kimutattuk (*Nikfardjam et al. 2006 Food Chem 98:453-462.*, *Avar et al. 2007 J Mol Sci 8:1028-1038.*), MALDI eredményeink csupán megerősítették ezeket.



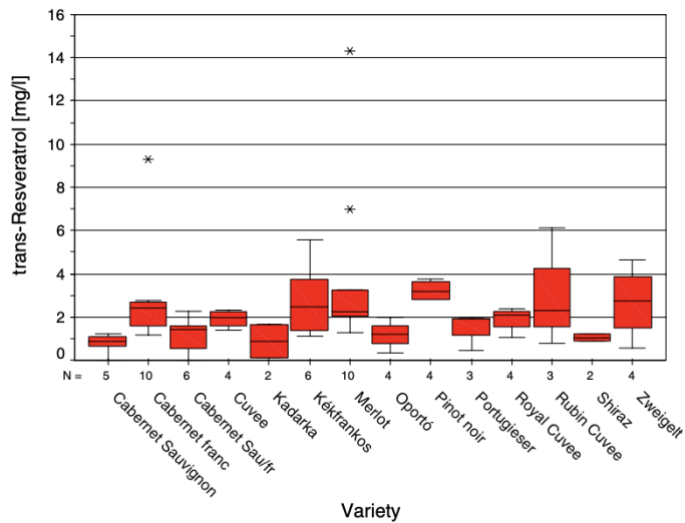
A Vlyan, Polgár és Bock pincészet különböző fajtájú és évjáratú borainak statisztikai vizsgálata (doktori mű 37. ábra).



Teljes polifenol (sárga) és antocianin (piros) koncentrációk alakulása a fajta függvényében (Nikfardjam et al. 2006)



A transz-rezveratrol koncentrációja az évjárat függvényében (Nikfardjam et al. 2006)

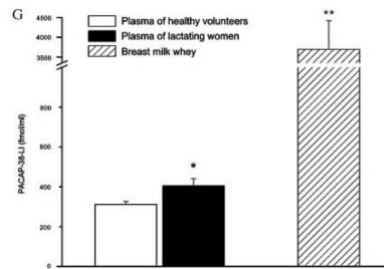


A transz-rezveratrol koncentrációja a fajta függvényében (Nikfardjam et al. 2006)

8. MALDI MS vizsgálatainkat a PACAP kvalitatív kimutatásának érdekében fejlesztettük ki és alkalmaztuk széleskörűen. Sajnálatos módon a PACAP kvantitatív vizsgálatára jelenleg nincs validált tömegspektrometriás módszer. Munkacsoportomban is számos technikát teszteltünk annak érdekében, hogy reprodukálható kvantitatív analitikai lehetőséget adjunk a kollégák kezébe. A közel egy évtizedes munka azonban sikertelennek bizonyult. Nem sikerült reprodukálható és kellően érzékeny módszert fejlesztenünk az összetett analitikai probléma megoldására.

A disszertációmban szereplő kvantitatív eredmények a PACAP vonatkozásában, mint azt a 65., 66., 67., 74. oldalakon is említettem radioimmunoassay (RIA) mérésekkel történtek, amelyek a PACAP-38-szerű immunreaktivitás meghatározásán alapultak. Mint ahogy azt disszertációban is említettem, a RIA a PACAP vonatkozásában a nemzetközi szakirodalomban elfogadott, tudományosan elismert módszer, azonban jelentős hibákkal terhelt. Sajnálatos módon megbízhatóbb és érzékenyebb analitika hiányában azonban nincs lehetőségünk más technikát alkalmazni.

Örülök opponens úr anyatej PACAP koncentrációjának vizsgálatára irányuló kérdésének, hiszen az anyatej PACAP-38 koncentrációjának meghatározása rendkívüli jelentőségű. A 65-66. oldalon ismertetem az anyatej minták gyűjtésének és előkészítésének rövid menetét, illetve a vizsgálatok eredményeit, amelyeket a 40. ábra foglal össze. Az anyatej minták PACAP-szerű immunaktivitása, tehát megközelítő PACAP-38 koncentrációja átlagosan tízszeres (5-20X) növekedést mutatott a vérplazmában detektált értékhez képest (ca. 3500 fmol/ml) (40.G ábra).



A disszertáció 40. ábrájának (66. oldal) részlete, amely szemlélteti a PACAP-38 koncentrációját a vérplazmában és az anyatejben.

Az anyatej rendkívüli PACAP-38 koncentrációja a csecsemőkorai táplálás fontosságára és a polipeptid korai neurális fejlődésben betöltött szerepére utalhat.

9. Elfogadom opponens úr kételyeit a detektált  $\text{Na}^+$  addukttal kapcsolatban. Jelentős bizonytalanságot hordoz a kérdéses PACAP származék keletkezése. A peptidok és fehérjék fiziológiai körülmények között nátriumion-fehérje komplexek formájában megjelenhetnek, azonban ezek a gyenge elektrosztatikus kötőerőkre épülő struktúrák tömegspektrometrián nem detektálhatók. A PACAP primer szerkezete (pl. poláris aminosavak) révén könnyen elképzelhető, hogy a szerkezetben  $\text{Na}^+$ -ion komplexekben is megjelenik, azonban ez nem bizonyított. Szinte biztosra vehető, hogy a mintaelőkészítés, illetve az alkalmazott oldószerek hatására jött létre a tömegspektrometrián detektált  $\text{Na}^+$  addukt. Munkám során nem volt célom a kérdéses

addukt fiziológiás jelenlétének kimutatása csupán a PACAP-38 MALDI TOF MS detektálása patkány vérplazmából. Az adott közleményben tárgyalt módszerfejlesztés és analitikai eredmények jelentősége azok újdonságtartalmában rejlik, hiszen ez volt az első olyan publikáció, amelyben PACAP-38 tömegspektrometriás detektálását a szakirodalomban ismertettük.

10. A PACAP egy pleiotróp hatású neuropeptid, amely elsősorban a PAC1 receptoron keresztül fejt ki hatását. A receptor aktivációja az adenilát-cikláz–cAMP–protein-kináz A (PKA) jelátviteli útvonal mellett a MAPK/ERK és PI3K/Akt kaszkádokat is aktiválja. Ezek a jelátviteli utak kulcsszerepet játszanak a sejtek túlélésében, valamint az oxidatív stressz elleni védekezésben, többek között antioxidáns és stresszválasz gének transzkripciójának szabályozásán keresztül.

A glutation (GSH) a sejtek legfontosabb nem enzimatis antioxiánsa. PACAP jelenlétében fokozódik a glutation-szintézishez és -regenerációhoz kapcsolódó enzimek aktivitása, részben az Nrf2 transzkripció faktor aktivációján keresztül. Ennek következtében oxidatív terhelés során hatékonyabb ROS-semlegesítés valósul meg. Fiatal állatokban a PACAP hiánya csak mérsékelt változást eredményez a GSH-szintben, mivel az antioxiáns rendszer kompenzációs mechanizmusai még megfelelően működnek. Ezzel szemben idős PACAP-hiányos állatokban a glutationtartalom jelentősen csökken, ami fokozott oxidatív károsodással és sejtszintű diszfunkcióval társul.

A szuperoxid-dizmutáz az enzimatis antioxiáns védekezés egyik kulcseleme. PACAP jelenlétében a SOD aktivitása emelkedett, ami a szuperoxid gyökök hatékony eliminációját biztosítja. PACAP hiányában – különösen idős állatok esetében – a SOD aktivitás csökken, miközben nő a lipidperoxidáció és más oxidatív stressz markerek szintje. Ez arra utal, hogy a PACAP fontos szerepet játszik az enzimatis antioxiáns védelem fenntartásában az öregedés során.

A hőshockfehérjék (HSP) a sejtes stresszválasz meghatározó komponensei, amelyek biztosítják a fehérjék megfelelő konformációját és elősegítik a sérült fehérjék eltávolítását. A PACAP közvetetten modulálja a HSP-expressziót a stresszjelátviteli útvonalak (ERK, CREB) szabályozásán keresztül. PACAP jelenlétében a sejtek adaptív stresszválasza hatékonyabb, míg PACAP hiányában – különösen idős korban – csökken a HSP-expresszió, ami rontja a sejtek oxidatív stresszel szembeni ellenálló képességét (*Douiri et al. 2016 J Neurochem. 137(6):913-30., Reglödi et al. 2004 Reg Pep 123 (1-3):51-59., Ferencz et al. 2010 J Mol Neurosci 42:428-34., Ferencz et al. 2009 J Mol Neurosci 37:168-76.*)

11. Az agyszövet feldolgozása során alkalmazott mintaelőkészítési eljárás garantálta a só- és lipidmentes mintákat, amelynek megfelelően a kérdéses m/z tartományon belül peptidek és polipeptidek voltak detektálhatók. A csiga CNS homogenizátum minták előkészítését és tisztítását a következők szerint végeztem el: A mintákat 13000 g-vel 4°C-on 10 percig centrifugáltam, ami az alacsony oldhatóságú lipidfrakció jelentős hányadát eltávolította az elegyből. Ezt követően C<sub>4</sub>, illetve C<sub>18</sub> ZipTip szilárd fázisú extrakciót (SPE) hajtottam végre, amely megtisztítja a mintákat a sók és lipidek maradványaitól. Elsőként az oszlop töltetét kondicionáltam és aktiváltam 100%

acetonitril, majd 0,1% hangyasav vizes oldata segítségével. Ezt követte a minták felvitele, amikor a hidrophil összetevők, sók, metabolitok nem kötődnek az oszlophoz, míg a lipidmaradványok, peptidek, proteinek specifikusan kikötődnek a felületre. A 0,1%-os hangyasav oldattal való mosást követően a lipidmaradványokat 5%-os acetonitril - 0,1% vizes hangyasav eleggyel távolítottam el. Végül a peptidek/polipeptidek lemosása a szilárd fázisról magas szerves komponens tartalmú eleggyel, tipikusan 50-80% acetonitril - 0,1% hangyasav oldattal történt. Tapasztalataink alapján az így tisztított minták só- és lipidmentesnek tekinthetők.

A tumoros minták lipid vizsgálatánál specifikus extrakciós technikát alkalmaztam a lipidfrakció tisztítása érdekében (*Schmidt et al. 2020 Oncotarget 11:2702-2717.*). A 20 mg tumoros és nem neoplasztikus stróma szövetet vízben 5 percig, 4°C-on homogenizáltam cirkónium-oxid gyöngyök (0,5 mm) jelenlétében. A homogenizátum egy részét (2 mg nedves tömegnek megfelelő) azonnal egyfázisú metanolos lipid extrakciónak vettem alá. A homogenizátumot 1 ml 0,001% butilezett hidroxi-toluolt tartalmazó metanolban ultrahanggal 5 percig kezeltem. majd 10 000 g-vel 5 percig centrifugáltam. A felülúszót egy új Eppendorf csőbe vittem át. A kivonatokat -20°C-on tároltam az MS analízisig.

Köszönöm, hogy a dolgozat részletes és alapos kritikai értékelését követően elismerően nyilatkozik eddigi tudományos és innovációs eredményeimről.

Bízva válaszaim elfogadásában és azok pozitív elbírálásában, tisztelettel:

Pécs, 2026. február 26.



Dr. Márk László